

博士論文

RNA ヘリケース DHX9 による

哺乳動物マイクロ RNA の成熟制御機構

Regulatory mechanism of microRNA processing
mediated by RNA helicase DHX9 in mammalian cells

指導教員 鈴木 勉 教授

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

鈴木研究室

37-147143 八代 悠歌

序論

microRNA (miRNA)は、約 20 塩基程度の短い非コード RNA であり、Argonaute (Ago) タンパク質などと RNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を形成することにより、配列特異的に mRNA の分解や翻訳の抑制を引き起こす。miRNA は時空間的にその発現プロファイルを変化させ、遺伝子発現を調整することで、様々な生命現象と密接に関与していることが知られている。したがって、miRNA の発現調節機構を理解することは、生命現象の理解につながる重要な研究対象である。

miRNA は複数の酵素による多段階のプロセスを経て生合成されている (図 1.)。miRNA 遺伝子の初期転写物である pri-miRNA は核内で Drosha/DGCR8 によるプロセッシングを受け、ヘアピン構造を持つ約 60 塩基程度の pre-miRNA を生じる。pre-miRNA は Exportin-5/Ran-GTP 複合体により細胞質へと輸送され、Dicer/TRBP 複合体による 2 度目のプロセッシングを受けて成熟 miRNA となり、Ago にロードされることにより RISC を形成する(1)。近年の研究で、miRNA の発現量は、転写制御のみならず、転写後におけるプロセッシング過程や成熟 miRNA の代謝によっても、コントロールされることが明らかにされつつある(2-4)。

私は、miRNA の発現を転写後の過程で制御する因子を探索する過程で、boxB タグを挿入した miRNA 前駆

体 pre-mir-92a-1 を HEK293T 細胞で一過的に発現させてプルダウンし、共沈降するタンパク質の解析を行ったところ、DHX9 (RHA; RNA helicase A) が特異的に結合することを見出した。この結果は、DHX9 が miRNA 前駆体と相互作用することにより、miRNA の成熟を制御する可能性を示唆するものである。DHX9 は、DEAH ファミリーに属する ATP 依存的な RNA ヘリケースであり、ヘリケースドメインに加えて 2 つの二本鎖 RNA 結合ドメインを持つ(5)。転写や翻訳の制御に関与するほか(6, 7)、ヒトでは Alu 配列を主な標的とし、環状 RNA の生成や、異常なスプライシングを抑制することが報告されている(8)。また、DHX9 は Ago や Dicer などの RISC のコンポーネントと相互作用することが報告されており(9)、miRNA の成熟過程への寄与が示唆されていたが(10, 11)、DHX9 がどのような miRNA を標的とし、miRNA の成熟過程においてどのような役割を果たすのかは未解明であった。そこで本研究では、DHX9 をノックダウンした細胞において、miRNA を次世代シーケンス解析することにより、DHX9 の miRNA 成熟過程における機能を明らかにすることを目的とした。

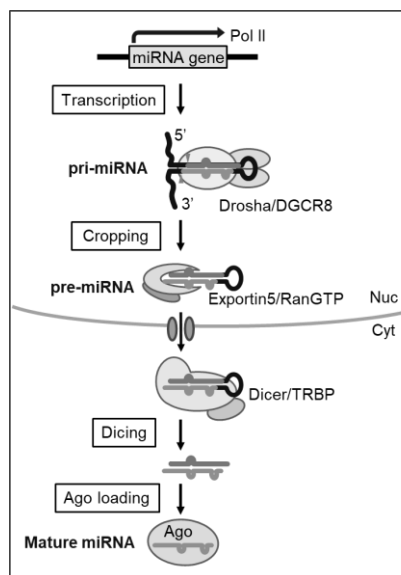


図 1. miRNA の生合成経路

本論

第一章 DHX9 ノックダウン細胞における miRNA の次世代シーケンス解析

はじめに、DHX9 が miRNA の成熟過程にどのように作用しているかを網羅的に調べるために、DHX9 をノックダウンした細胞において、Ago2 と結合した miRNA の次世代シーケンスをおこなった。その結果、予想と反して、前駆体 pre-miRNA が DHX9 と共沈降した miRNA の発現には変化がみられなかったが、DHX9 のノックダウンにより多数の miRNA の発現量が増加することを見出した。特に、DHX9 のノックダウンにより一部の miRNA の発現量が顕著に増加することが判明した。これは、DHX9 がこれらの miRNA の発現を負に制御していることを示唆する結果である。また、DHX9 ノックダウンによる miRNA の発現量の増加は、ヒト由来の培養細胞である HEK293T と HeLa およびマウス由来の NIH3T3 細胞において共通して観察された。一方で、ヒト由来の細胞とマウス由来の細胞において、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA 種を比較すると、三種類の培養細胞で多数の miRNA が共通して発現していたにも関わらず、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA のほとんどは、ヒト由来の細胞またはマウス由来の細胞にのみ発現している miRNA であった。そこで、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA の保存性を調べると、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA は、哺乳動物間における保存性が低い傾向があることが明らかになった。興味深いことに、ヒト細胞においては、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA の約半数近くが miR-548 のファミリーの miRNA であることが判明した。miR-548 ファミリーの miRNA は MADE1 とよばれる霊長類特異的な反復配列に由来する miRNA であり、転写領域に存在する MADE1 が転写されると、miRNA 前駆体と類似したヘアピン構造を形成し、Drosha/DGCR8 によるプロセッシングを受けるため、miRNA を生成する(12)。以上の結果は、DHX9 が、保存性の低い miRNA、特にヒト細胞では MADE1 に由来する miRNA を主要な標的とし、これらの miRNA の発現を抑制する機能をもつことを示唆している。

第二章 DHX9 ノックダウン細胞における mRNA の次世代シーケンス解析

DHX9 は RNA ポリメラーゼ II と相互作用することにより、転写制御に関与することが知られている(6)。そこで、DHX9 のノックダウンによる miRNA の増加が、miRNA 遺伝子の転写量の増加に起因するかを調べるために、DHX9 をノックダウンした細胞において、mRNA の次世代シーケンスをおこなった。多くの miRNA 遺伝子は、RNA ポリメラーゼ II によって転写される遺伝子領域内のイントロンにコードされているため、同一転写物のエキソン部分にコードされた遺伝子 (ホスト遺伝子) の発現量を解析することにより、miRNA 遺伝子の転写量変化を評価した。その結果、DHX9 のノックダウンにより発現量が増加した miRNA のホスト遺伝子のほとんどが、DHX9 のノックダウンにより有意な発現量変動を示さないことが明らかになった。このことから、DHX9 が、これらの miRNA の発現を転写後の成熟過程において抑制していることが示唆された。

また、DHX9 が miRNA の発現抑制を介して、遺伝子の発現調節に関与するかを調べるために、miRNA のターゲット mRNA の発現量変動を解析した。その結果、DHX9 をノックダウンすると、DHX9 の標的となる miRNA のターゲット mRNA の発現量が減少傾向を示すことが判明した。このことは、DHX9 が miRNA の発現制御を介して、遺伝子の発現調節を行うことを示唆している。

第三章 DHX9 存在下における pri-miRNA の試験管内プロセシング反応の解析

次に、DHX9 の細胞内における局在が主に核内であることから(13)、DHX9 が、核内における miRNA のプロセシング過程を負に制御する可能性に着目し、DHX9 が Drosha/DGCR8 による pri-miRNA のプロセシングを阻害するかを試験管内において検証した。

MADE1 に由来する miRNA の前駆体である pri-mir-548d と、DHX9 のノックダウンによる有意な発現変動がみられなかった miR-16 の前駆体 pri-mir-16-1 をコントロールとして用い、Drosha/DGCR8 による切断反応をおこなったところ、pri-mir-16-1 は 100% 近く切断されたが、pri-mir-548d は 30% 程度しか切断されなかった。この結果は、pri-mir-548d の Drosha/DGCR8 によるプロセシング効率が pri-mir-16-1 と比べてより低いことを意味する。さらに、DHX9 存在下において切断反応をおこなった結果、DHX9 タンパク質量依存的に pri-miRNA の切断率の低下が観察された。また、反応系に ATP を加えると、DHX9 による pri-mir-16-1 の切断阻害はほとんど観察されなくなったのに対し、pri-mir-548d の切断は ATP 存在下においても若干阻害された。これらの結果により、DHX9 が試験管内において pri-miRNA の Drosha/DGCR8 によるプロセシングを阻害する活性を持つことが示された。DHX9 による pri-miRNA のプロセシング阻害は、DHX9 が pri-miRNA と結合することにより Drosha/DGCR8 による切断を妨げた結果であると推察される。また、DHX9 は ATP 依存的な RNA ヘリケースであり、ATP 存在下では RNA との解離が促進されることが知られている(5)。このために、ATP 存在下では DHX9 によるプロセシングの阻害が緩和したと考えられる。しかしながら、MADE1 由来の miRNA 前駆体のプロセシングは ATP 存在下においても観察された。これは、MADE1 由来の miRNA 前駆体が、ATP 存在下においても DHX9 と強く結合するか、あるいは、Drosha/DGCR8 によるプロセシング効率が低いために、ATP 存在下であっても DHX9 による影響を受けやすいためであると推察される。

第四章 RISC 中に含まれる miRNA 以外の低分子 RNA の解析

これまでの結果から、DHX9 は、霊長類特異的な反復配列である MADE1 由来の miRNA を含む、進化的により新しい miRNA 遺伝子の発現を、Drosha/DGCR8 によるプロセシングを阻害することにより抑制する可能性が示された。このことから、DHX9 が、こうした miRNA の発現を制御することにより遺伝子の発現調節に寄与するだけではなく、ゲノム配列中に偶発的に生じたヘアピン構造を形成しうる配列から、低分子 RNA が発生するのを防ぐ機能をもつのではないかと着想した。そこで、DHX9 をノックダウンした細胞における

Ago2 と結合した miRNA の次世代シーケンスの結果を用い、miRNA 遺伝子としてアノテーションされていないヘアピン構造に由来する低分子 RNA を探索した。さらに DHX9 ノックダウンにより、同定した低分子 RNA の発現変動を解析した。HEK293T 細胞におけるデータを用いて miRNA 遺伝子以外のヘアピン構造に由来する低分子 RNA を探索した結果、183 の遺伝子座に由来する低分子 RNA が、コントロールおよび DHX9 ノックダウンした細胞において共通して見つかった。また、これらの低分子 RNA のうち、一定量以上の発現量がみられた 28 の遺伝子座に着目すると、19 の遺伝子座に由来する低分子 RNA が DHX9 のノックダウンにより増加していることが明らかになった。この結果は、DHX9 が転写産物中に生じたランダムなヘアピン構造から、低分子 RNA が生成することを防ぐ機能をもつ可能性を示唆している。

結論と今後の展望

本研究により私は、DHX9 をノックダウンすると、反復配列に由来する miRNA を含めた保存性の低い miRNA や、miRNA 遺伝子以外のヘアピンに由来する低分子 RNA の発現が転写後の段階で増加することを見出した。また、試験管内において DHX9 が pri-miRNA の Drosha/DGCR8 によるプロセッシングを阻害する活性を持つことを示した。以上の成果から、DHX9 が、生物種特異的な miRNA を標的として発現を抑制することにより、細胞の遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆される。また、DHX9 がトランスポゾンの挿入やゲノム配列の変異により生じたヘアピン構造から偶発的に miRNA が生じることを防ぐ機能を持つ可能性を示した。しかしながら、DHX9 がどのようなメカニズムで、標的 miRNA の発現を特異的に抑制するのかを明らかにするためには、今後さらなる生化学的解析が必要である。また、DHX9 による発現抑制を受ける miRNA の、ターゲット遺伝子の解析を進めることにより、将来的に、DHX9 による miRNA を介した遺伝子発現調節機構の生理的機能を明らかにしていきたい。

参考文献

1. V. N. Kim, J. Han, M. C. Siomi, Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 126-139 (2009).
2. M. Ha, V. N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 509-524 (2014).
3. T. Treiber, N. Treiber, G. Meister, Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 5-20 (2019).
4. Z. S. Kai, A. E. Pasquinelli, MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 5-10 (2010).
5. C. G. Lee, J. Hurwitz, A NEW RNA HELICASE ISOLATED FROM HELA-CELLS THAT CATALYTICALLY TRANSLOCATES IN THE 3' TO 5' DIRECTION. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 4398-4407 (1992).
6. T. Nakajima *et al.*, RNA helicase a mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**, 1107-1112 (1997).
7. T. R. Hartman *et al.*, RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 509-516 (2006).
8. T. Aktas *et al.*, DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* **544**, 115+ (2017).
9. G. B. Robb, T. M. Rana, RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Molecular Cell* **26**, 523-537 (2007).
10. S. Kawai, A. Amano, BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *Journal of Cell Biology* **197**, 201-208 (2012).
11. E. Shin *et al.*, An alternative miRISC targets a cancer-associated coding sequence mutation in FOXL2. *EMBO J*, e104719 (2020).
12. J. Piriyaopongsa, I. K. Jordan, A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS One* **2**, e203 (2007).
13. H. L. Tang, G. M. Gaietta, W. H. Fischer, M. H. Ellisman, F. WongStaal, A cellular cofactor for the constitutive transport element of type D retrovirus. *Science* **276**, 1412-1415 (1997).